

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-77798

(43) 公開日 平成9年(1997)3月25日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	片内整理番号	P I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/18			C 0 7 K 16/18	
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	D
33/531			33/531	A
33/577			33/577	B
# A 6 1 K 39/395			A 6 1 K 39/395	D
審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 12 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-256958

(22) 出願日 平成7年(1995)9月8日

(71) 出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町8丁目1番2号

(72) 発明者 小 林 則 文

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(72) 発明者 鈴 置 純

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(54) 【発明の名称】 抗コレステリルエステル転送蛋白抗体

(57) 【要約】

【課題】コレステリルエステル転送蛋白 (CETP) に対して高力価を有し、測定妨害物質である血中蛋白質に対する交差反応性が低く、且つ CETP 分子中に安定に存在する抗原決定基を認識する抗 CETP 抗体、及び該抗体を用いた簡便且つ高精度な検体中の CETP の免疫学的測定法、並びにこれに用いる CETP 測定用試薬の提供。

【解決手段】 CETP に対して高力価を有し、且つ血中に存在する測定妨害物質に対して交差反応性を有さないモノクローナル抗体、及び予め SDS で処理した検体と、該抗体とを、SDS の存在下で反応させて抗原抗体複合物を生成させることを特徴とする。検体中の CETP の免疫学的測定法、並びにこれに用いる CETP 測定用試薬。

BEST AVAILABLE COPY

(2)

特開平9-77798

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コレスチリルエステル転送蛋白に対して高力価を有し、且つ血中に存在する測定妨害物質に対して交差反応性を有さないモノクローナル抗体。

【請求項2】 ドデシル硫酸ナトリウムで処理したコレスチリルエステル転送蛋白と特異的に反応する抗体。

【請求項3】 ドデシル硫酸ナトリウムで処理したコレスチリルエステル転送蛋白と特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項4】 予めドデシル硫酸ナトリウムで処理した検体と、請求項2又は3に記載の抗体とを、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下で反応させて抗原抗体複合物を生成させることを特徴とする、検体中のコレスチリルエステル転送蛋白の免疫学的測定法。

【請求項5】 請求項1～3の何れかに記載の抗体を含んでなることを特徴とする、コレスチリルエステル転送蛋白測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、コレスチリルエステル転送蛋白(Cholesteryl ester transfer protein:以下CETPと略記する。)に対する抗体、及び該抗体を用いたCETPの免疫学的測定法、並びに、これに用いるCETP測定用試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 CETPは、高比重リポ蛋白(HDL)中のコレスチリルエステル(CE)を引き抜き、超低比重リポ蛋白(VLDL)、中間比重リポ蛋白(IDL)、低比重リポ蛋白(LDL)へ転送する働きを有する蛋白質で、コレステロール代謝経路の一つである、所謂コレスチリルエステル転送経路に於ける中心的な役割を果たすものの一つである。

【0003】 このCETPは、1980年代後半には、いくつかのグループにより完全精製法が確立されている蛋白であり [Jamaquin, A.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A 84, 1854-1857(1987); Hesler, C.B., et al., J. Biol. Chem. 262, 2275-2282(1987); Kato, H., et al., J. Biol. Chem. 264, 4082-4087(1989)]。m-RNAを用いた解析によると、肝臓、脾臓、脂肪組織、小腸及び副腎等の臓器等で主に生合成され、生体内に於ては血中に存在することが知られている。ヒトのCETPは、476個のアミノ酸からなる分子量約74000のシアル酸を含む糖蛋白質であり、糖鎖を完全に切断した場合の分子量は約58000となることが判っている。また、CETPは、構成アミノ酸のうち約49%が疎水性のアミノ酸よりなるため、他の血中蛋白質に比べて極めて疎水性が高いことが特徴である。

【0004】 CETPの生体内での作用機序については、未だ解明されていない点が多いが、動脈壁中のマク

2

ロファージや平滑筋細胞に於けるCETPの生成が、動脈壁からのコレステロールの除去に関与していることを示唆する報告 [Stein, O., et al., Arteriosclerosis 5, 76-78(1986)] がなされており、この場合CETPは抗動脈硬化的に働いている可能性が考えられる。

【0005】 一方、血中CETP活性の強さは動物種によって異なり、例えば兔では非常に強く、ラット、羊等は殆ど活性が認められない。ヒトCETP活性はこの中間であるが、CETP活性の強い動物種ではコレステロール負荷による動脈硬化が著起されやすく、逆にCETP活性の低い動物種では動脈硬化が誘発されにくいことが知られている。また、組織細胞から肝臓へコレステロールを逆転送する経路のコレステロールの運搬体として知られるHDLでは、HDL中のコレステロール(HDLコレステロール)の血中濃度と虚血性心疾患との間で負の相関があり、逆に組織細胞へのコレステロールの運搬体であるLDLでは、LDL中のコレステロール(LDLコレステロール)の血中濃度と虚血性心疾患との間で正の相関があることが知られている。遺伝性のCETP活性欠損症は、CETP活性を欠損しているために血中HDLコレステロール濃度が上昇し、高HDLコレステロール血症となるが、この患者系では長寿のものが多く認められている [Inazu, A., et al., N. Engl. J. Med. 323, 1234-1238(1990)]。これはCETPが欠損していることにより、動脈硬化が誘発されにくいので、結果的に動脈硬化等の成人病の発病が起こりにくいためであると考えられている。更に、CETP活性を高めるために、ヒトのCETP遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスでは、HDLが20～30%減少し [Aqelion, L.B., et al., J. Biol. Chem. 265, 10795-10801(1991)]。これに高コレステロール添加食を与えた場合、冠動脈硬化が起こり、CETPが動脈硬化を促進することを示唆する知見が報告されている [Marotti, K.R., et al., Nature 365, 73-75(1993)]。また更に、原発性胆汁性肝硬変(PBC)の患者検体に於ても、CETP活性が上昇することが知られており、PBCの指標としての有用性が示唆されている。

【0006】 以上述べた如く、CETP活性又はCETP濃度を正確に測定することは、動脈硬化関連疾患や肝疾患等の研究分野に於て、或いはこれら疾患の診断分野に於て極めて重要であると考えられており、これまでCETPを測定するために、CETP活性を測定する方法やCETP濃度を測定する方法等、様々な測定法が試みられてきた。

【0007】 CETP活性を測定する方法としては、例えば、コレスチリルエステル(CE)をラジオアイソトープで標識したドナーリポ蛋白(HDL)とアクセプターリポ蛋白(VLDL、IDL、LDL)とを一定の割合で含有する反応液に試料を加え、一定温度で一定時間加温する。その後、超遠心法又はヘパリン-マンガン法

(3)

特開平9-77798

3

等の沈殿法を用いて、ドナーリポ蛋白とアクセプターリポ蛋白とを分離し、それぞれの放射活性を測定し、CE転送活性を算出する方法〔新井洋由、井上圭三、The Lipid 2/2,183-195(1991)〕等が知られている。しかしながら、この活性測定法では、高度な技術と特殊な設備を必要とし、且つ操作が非常に煩雑であるうえに測定に長時間を要するという問題があった。

【0008】また、CETP濃度を測定する方法としては、抗体を用いたイムノアッセイ法も報告されている

〔Y.L.Marcel,et.al.,J.Clin.Invest. 85,10-17(1990), H.Mezdour,et.al.,J.Clin.Chem. 40/4,593-597(1994)〕。しかしながら、このようなイムノアッセイ法に使用されている抗体の殆どは、CETPのC末端側の極めて不安定な脂質転送活性部位付近を認識しており、CETP分子中に存在する安定な抗原決定部位を認識していないので〔Y.L.Marcel,et.al.,J.Clin.Invest. 85,10-17(1990)〕、検体中のCETPの脂質転送活性が失われると同時にCETP濃度も測定不可能となる、という問題があった。加えて、精製CETPや検体中に存在するCETPは極めて不安定であり、溶剤融解や4℃での保存で容易に脂質転送活性が失われることが知られており、通常、このCETPの失活を防止するために、精製CETPや検体を-80℃以下の超低温で保存しなければならない、という問題もあった。これらのことは、精製CETPを使用した標準品の作製を困難にし、測定されたCETP活性或いは濃度自体の信頼性を低くし、ひいては市販のCETP測定キットの開発を困難ならしめている大きな要因ともなっていた。

【0009】また、このような従来の抗体は、例えば、アルブミン、イムノグロブリン、フィブリノーゲン等の血中蛋白質に対して著しい交差反応性を示すことが確認されており、そのため、このような抗体を用いても、血中のCETPを正確に測定することは極めて困難であった。

【0010】また、これらの問題を解消するために、CETP分子中に安定に存在し、且つ測定妨害物質である血中蛋白質に対して交差反応性を示さない部分をエピトープとして認識する抗体の取得方法として、例えば、公知のCETPのアミノ酸配列から化学的に合成した合成ペプチドを免疫原として抗体を作製する方法等も提案されている。しかしながら、この方法で得られた抗体は、測定妨害物質となる血中蛋白質に対する交差反応の程度は低いものの、CETPに対する反応性も低いため、CETP測定系を組むために用いるには問題の多いものであった。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、CETPに対して高力価を有し、測定妨害物質である血中蛋白質に対する交差反応の程度が低く、且つCETP分子中に安定に存在する

4

抗原決定基を認識する抗CETP抗体、及び該抗体を用いた簡便且つ高精度な検体中のCETPの免疫学的測定法、並びに、これに用いるCETP測定用試薬を提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明は、(1)CETPに対して高力価を有し、且つ血中に存在する測定妨害物質に対して交差反応性を有さないモノクローナル抗体、の発明である。

【0013】また、本発明は、(2)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で処理したCETPと特異的に反応する抗体、の発明である。

【0014】更に、本発明は、(3)SDSで処理したCETPと特異的に反応するモノクローナル抗体、の発明である。

【0015】更にまた、本発明は、(4)予めSDSで処理した検体と、上記(2)又は(3)に記載の抗体とを、SDSの存在下で反応させて抗原抗体複合物を生成させることを特徴とする、検体中のCETPの免疫学的測定法、の発明である。

【0016】また、本発明は、(5)上記(1)～(3)の何れかに記載の抗体を含んでなることを特徴とする、CETP測定用試薬、の発明である。

【0017】即ち、本発明者らは、CETPに対して高力価を有し、測定妨害物質である血中蛋白質に対する交差反応の程度が低く、且つCETP分子中に安定に存在する抗原決定基を認識する抗CETP抗体を得るために鋭意研究を重ねた結果、予めSDSで処理し、負荷電状態としたCETPを免疫原として用いることにより、CETP分子中に安定に存在する抗原決定基を認識し、測定妨害物質である血中蛋白質に対して交差反応性を有さず、且つCETP、特にSDS処理したCETPに対して高力価を有する抗CETP抗体を得ることができることを見出した。更には、意外にも、該抗体を使用し検体中のCETPを測定する場合に、検体を予めSDSで処理し、次いで、この検体と該抗体とを、本発明であれば抗原抗体反応を強く阻害するSDSの存在下で反応させれば、検体中のCETPを、簡便に、特異的且つ高精度に測定することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0018】本発明の抗CETP抗体は、SDSで処理し、負荷電状態としたCETPを免疫原とすることにより得られ、CETP、特にSDS処理したCETPに対して高力価を有し、且つ血中に存在する測定妨害物質である、例えばアルブミン、イムノグロブリン、フィブリノーゲン等の血中蛋白質に対して交差反応を有さないもの(交差反応の程度が低いもの、即ち、該抗CETP抗体を使用したCETP測定に於て、実用上問題となるような交差反応性を示さないものを含む。)である。また、本発明のSDSで処理したCETPと特異的に反応

(4)

特開平9-77798

5

する抗CETP抗体は、SDSで処理したCETPに特異性を有するものであれば、特に限定されないが、未処理のCETPに対して反応性を有さないもの、或いは反応性が低いものであって、血中の測定妨害物質（例えばアルブミン、イムノグロブリン、フィブリノーゲン等）と交差反応性を全く有さないか、或いは交差反応の程度が低い（即ち、実用上該抗CETP抗体を使用したCETP測定に影響を及ぼさないようなもの）抗体であることが好ましい。本発明の抗CETP抗体は、上記した如き性質を有するものであればその由来については特に限定されず、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であっても何れにても良い。

【0019】このような性質を有するポリクローナル抗体を得る方法としては、SDS処理したCETPを、例えば馬、牛、羊、山羊、兎、モルモット、ラット、マウス等の動物に免疫する畜法により得られる抗CETPポリクローナル抗体血清を、SDS処理したCETPを固定化したアフィニティークラムにより精製することにより得る方法等が挙げられる。

【0020】また、本発明の抗CETPモノクローナル抗体を得る方法としては、SDS処理し、負荷電状態としたCETPを免疫原として免疫した、例えば馬、牛、羊、山羊、兎、モルモット、ラット、マウス等の動物の、例えば脾細胞、リンパ球等の免疫感作された細胞と、例えば骨髄腫細胞等の永久的に増殖する性質を有する細胞とを、ケラーとミルシュタインらにより開発された自体公知の細胞融合技術により融合させてハイブリドーマを作製し、SDS処理したCETPと特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選択し、該ハイブリドーマを培地中に培養するか、動物の腹腔内に投与して腹水中に抗体を生産させて、該培養物又は腹水より目的のモノクローナル抗体を採取する方法。例えば遺伝子組換え技術等を応用した自体公知の方法【Eur. J. Immunol., 6, 511(1976)】により上記した如き性質を有する抗体を生産する細胞を作製し、この細胞を培養することにより目的のモノクローナル抗体を採取する方法等が挙げられる。

【0021】本発明の抗CETP抗体を得る方法に於て、免疫原として用いるSDS処理したCETPは、例えばヒト血漿を濃度勾配超遠心法、追続的等密度超遠心法等の超遠心法により比重1.21以上の画分とし、これをアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、硫酸アンモニウム分画、塩析等の自体公知の精製法により精製して得られる。所謂粗精製CETP【N.M. Pattnaik, et al., B.B.A. 539, 428-438, (1978)等】や、これを更に、例えばアフィニティークロマトグラフィー等により精製して得られる。所謂精製CETP【H. Kato, et al., J. Biol. Chem. 264/7, 4082-4087(1989)】を、SDS処理することにより得ることができる。より具体的には、例えば以下の如き方法により

5

得た粗精製CETP或いは精製CETPを用いればよい。

【0022】即ち、ヒト新鮮血漿に硫酸アンモニウムを加え50%飽和とした後、4℃で1～2時間攪拌する。次いで該溶液を7000rpmで30分間遠心処理し沈殿を得る。得られた沈殿を10mMリン酸緩衝液（0.15M NaCl, 2mM EDTA含有、pH7.4）で溶解し、該緩衝液を用いて4℃で一晩透析処理する。次いで、これにNaBrを添加溶解し、比重を1.21～1.25g/mlに調整した後、超遠心分離機にて、25500Gav.で16℃、1時間超遠心処理し、比重1.21g/ml以上の下層画分を回収する。回収した画分を、10mM Tris-HCl緩衝液（2M NaCl, 2mM EDTA含有、pH8.0）で予め平衡化しておいたフェニルセファロースCL-4Bカラム（φ2.6×60cm、ファルマシア社製）にかけてCETPを吸着させ、次いで、該カラムを、ベッド体積の約2倍量の10mM Tris-HCl緩衝液（2M NaCl, 2mM EDTA含有、pH8.0）で洗浄後、ベッド体積の約2倍量の2mM EDTA水溶液でCETP活性画分を溶出する。得られたCETP活性画分に、1/9容量の0.5M酢酸緩衝液（pH4.5）添加し、これを、50mM酢酸緩衝液（pH4.5）で平衡化したCM-セルロースカラム（CM-52）（φ2.5×17cm、ワットマン社製）にかけてCETPを吸着させ、次いで、ベッド体積の約10倍量の50mM酢酸緩衝液（pH4.5）で洗浄後、ベッド体積の約10倍量の50mM酢酸緩衝液（99mM NaCl含有、pH4.5）で活性画分を溶出すれば粗精製CETPを得ることができる。更に、得られた粗精製CETPを、39mMリン酸緩衝液（0.025% EDTA含有、pH6.8）を用いて透析した後、予め同緩衝液で平衡化したスクシニル化低比重リボ蛋白（LDL）を固定化したセファロース4Bカラム（φ1.5×18cm、ファルマシア社製）にかけてCETPを吸着させ、次いで、ベッド体積の約5倍量の該緩衝液で洗浄後、ベッド体積の約2倍量の4mMリン酸緩衝液（pH5.8）で活性画分を溶出すれば精製されたCETPを得ることができる。

【0023】上記の如き方法によって得られたCETPをSDS処理する方法としては、例えばCETPとSDSを共存させ、これを通常15～100℃、好ましくは25～100℃、より好ましくは37～100℃で、通常2分乃至20時間、好ましくは2分乃至2時間、より好ましくは2分乃至1時間加熱処理して負荷電状態とする方法、例えば自体公知のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりCETPを泳動し、負荷電状態とした後、該ポリアクリルアミドゲルからCETP画分を切り出し、これをホモジナイズする方法【役にたつ免疫実験法 p.9～10 嶋田孝吉 他編著 講談社】、例えば上記の2つの方法を組み合わせる方法等が挙げられる。

【0024】上記の如き方法で得られたSDS処理したCETPを用いて、本発明の抗CETPモノクローナル抗体を得る方法をより具体的に述べれば、例えば以下の如くなる。

(5)

特開平9-77798

7

【0025】即ち、先ず、上記の如き方法により得られたSDS処理したCETPと、完全フロイントアジュバント等のアジュバントとを混合して懸濁液を作製する。この懸濁液を前述の如き適当な動物に適当量、例えばCETP量として、通常1回量0.1~100 μ g、好ましくは0.1~10 μ gとなる量で、通常1~5週間毎に、好ましくは2~5週間毎に、通常3~10回、好ましくは3~8回、皮下、静脈内或いは腹腔内に投与して免疫する。免疫後、該動物より採血し、その抗血清がSDS処理したCETPと反応することを、例えばSDS処理したCETPを固相に用いた固相酵素免疫測定法(ELISA法)等の自体公知の方法により確認する。確認後、最終免疫から3日後に免疫化動物から脾臓を摘出し、脾細胞を常法により調製する。得られた脾細胞と、例えばNS-1細胞等の骨髓腫細胞とを常法に従い細胞融合し、常法に従って、融合細胞をHAT選択する。選択された融合細胞を培養し、培養上清を、SDS処理したCETPを固相に用いたELISA法や、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後ウエスタンブロットしたポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜を用いる免疫染色法に供して、上記の如き性質を有する抗CETP抗体を産生する細胞を更に選択する。次いで、限界希釈法によるクローニングを2回行い、安定して高力価の抗体を産生することが認められたものを抗CETPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。次いで常法に従い、得られたハイブリドーマを動物の腹腔内に注射し、腹水中に抗CETP抗体を産生させる。この腹水を採取し、例えば硫酸アンモニウム塩析、例えばリン酸緩衝液等の緩衝液を用いた透析、例えばDEAE-セロースカラム、プロテインAカラム等の通常この分野で使用される精製方法に従い精製し、精製モノクローナル抗体とする。尚、モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、二重免疫拡散法(金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 P.842-843)等の自体公知の方法によって行えばよい。

【0026】本発明の抗CETP抗体のより好ましい具体例としては、ハイブリドーマCM5a-27が生産するCM5a-27及びハイブリドーマCM5a-39が生産するCM5a-39が挙げられる。尚、ハイブリドーマCM5a-27及びハイブリドーマCM5a-39は、夫々平成7年9月6日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、寄託番号FERM P-15156及び寄託番号FERM P-15157として寄託してある。

【0027】本発明の抗CETPモノクローナル抗体を、検体中のCETPの免疫学的測定法により測定する際に利用すれば、検体中のCETPを従来法に於ける場合よりも簡便に且つ高精度に測定することが可能である。

【0028】本発明のCETPの免疫学的測定法は、SDS処理した検体と本発明の抗CETP抗体を用いて、

8

SDSの存在下でCETPと抗CETP抗体との抗原抗体複合物を生成させる以外は、自体公知の免疫学的測定法、例えば酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、免疫比濁法、免疫比濁法等の常法に従い実施すればよく、使用される試液類もこれら自体公知の方法に準じて適宜選択すればよい。

【0029】本発明のCETPの免疫学的測定法に於ける検体としては、CETPを含有するものであれば特に限定されないが、より具体的には、例えば血漿、血清、細胞粗浸液等の体液が挙げられる。

【0030】本発明の測定法を実施するには、先ず、検体をSDSで処理する。検体をSDSで処理する方法としては、SDSを用いて検体中のCETPを負荷電状態にさせ得る方法であれば特に限定されないが、例えば、SDS含有溶液と検体とを混合し、得られた混合液を加熱処理する方法等が挙げられる。混合液を加熱処理する場合は、例えばSDS含有溶液と検体とを混合し、得られた混合液を、通常15~100℃、好ましくは25~100℃、より好ましくは37~100℃で、通常2分乃至20時間、好ましくは2分乃至2時間、より好ましくは2分乃至1時間加熱処理することにより実施される。また、SDSの使用量としては、検体中のCETPを負荷電状態にさせ得る量であれば特に限定されないが、例えば上記の如きSDS含有溶液と検体とを混合し、得られた混合液を加熱処理する方法に於ては、混合液中の濃度として、通常0.001~10% (w/v)、好ましくは0.01~1% (w/v)の範囲から適宜選択される。

【0031】検体をSDSで処理する際に使用される、SDSを含有させる溶液としては、検体中のCETPを負荷電状態にすることを妨げる性質を有するものでなければよく、例えば①精製水、②例えばpH5~9、好ましくはpH6~8で、1~500mM、好ましくは1~50mMの例えばリン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、例えばBES緩衝液、MOPS緩衝液等のグッドの緩衝液、等が好ましく挙げられる。また、この溶液中には、検体中のCETPを負荷電状態にすることを妨げない量であれば、例えばNaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤等が含まれていても良い。

【0032】本発明のCETPの免疫学的測定法に於て用いられる抗CETP抗体は、SDS処理したCETPと特異的に反応するもの、即ち、未処理のCETPに対して反応性を有さないもの、或いは反応性が低いもの(例えば、未処理のCETPに対して殆ど反応性を有さないもの、未処理のCETPよりもSDSで処理したCETPに対する反応性の方が高いもの等)であれば特に限定されないが、このような性質を有するものであって、且つ血中に存在する測定妨害物質である、例えばアルブミン、イムノグロブリン、フィブリノーゲン等の血中蛋白質に対して交差反応性を有さないもの、或いは交

9

差反応の程度が低いもの（即ち、該抗CETP抗体を使用したCETP測定に於て、実用上問題となるような交差反応性を示さないもの）が好ましい。また、本発明のCETPの免疫学的測定法に於て用いられる抗CETP抗体としては、上記の如き性質を有するものであれば、例えば馬、牛、羊、山羊、兎、モルモット、ラット、マウス等の動物に由来するポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも何れでもよいが、特異性や品質の安定性等を考慮するとモノクローナル抗体の方が好ましい。このようなモノクローナル抗体としては、前述の如くして作製されたハイブリドーマから産生される抗CETPモノクローナル抗体が好ましく挙げられ、なかでも、ハイブリドーマCM5a-27が産生するCM5a-27及びハイブリドーマCM5a-39が産生するCM5a-39がより好ましく挙げられる。また、これら抗CETP抗体は単独で用いても良いし、適宜組み合わせ用いても良い。

【0033】本発明のCETPの免疫学的測定法に於いて、CETPと抗CETP抗体との抗原抗体複合物を生成させる反応は、SDSの存在下で行われる。また、SDSの使用量は、抗原抗体複合物の生成を妨げない量であれば特に限定されないが、少量では抗原抗体複合物の生成が不十分となり、また多量に存在する場合は、抗原抗体複合物の生成自体を阻害してしまうので、CETPと抗CETP抗体とを反応させる溶液中の濃度として、通常0.001~0.3%（w/v）、好ましくは0.01~0.1%（w/v）、より好ましくは0.02~0.03%（w/v）の範囲から適宜選択される。また、SDSの存在下でCETPと抗CETP抗体との抗原抗体複合物を生成させる反応に於ける反応条件としては、特に制限はなく、通常行われている反応条件と同様に行うことができるが、通常4~40℃、好ましくは25~37℃で、通常0.5~48時間、好ましくは1~5時間反応を行えばよい。尚、反応溶液中のSDS濃度が高い場合（例えば、0.1%以上の場合）は、15℃未満で反応を行うとSDSが析出する可能性があるため、このような場合は、15℃以上で反応を行うべきである。

【0034】本発明のCETPの免疫学的測定法の一例を示すと、以下の如くなる。即ち、前述の如くしてSDS処理した検体と一定量の抗CETP抗体（一次抗体）とをSDSの存在下で、要すれば適当な溶液中で、4~40℃で0.5~48時間反応させて抗原抗体複合物（検体中のCETP-抗CETP抗体複合物）を生成させた後、得られた反応液を、CETPを固定化した不溶性担体と接触させ、該反応液中の未反応の抗CETP抗体と固定化されたCETPとをSDSの存在下で4~40℃で0.5~48時間反応させて不溶性担体上に抗原抗体複合物（固定化CETP-抗CETP抗体複合物）を生成させる。更に、この不溶性担体を常法により洗浄した後に、抗CETP抗体に対する標識抗体（二次抗体、例えば、

(6)

特開平9-77798

19

抗CETP抗体がマウス由来のモノクローナル抗体である場合は、抗マウスIgG抗体に適当な標識をしたもの。）と4~40℃で0.5~16時間反応させて標識抗原抗体複合物（固定化CETP-抗CETP抗体-標識抗体複合物）を生成させ、該担体上の標識抗原抗体複合物中の標識量を測定する。得られた標識量を、予め濃度既知のCETP溶液を検体とし、上記と同じ試薬を用いた同様の操作を行って得た、標識量とCETP濃度との関係を示す検量線にあてはめることにより、検体中のCETP濃度を求めることができる。上記の例は、競合法の原理による測定法の例であるが、非競合法の原理に基づく測定法、所謂サンドイッチ法によっても、本発明の測定法を実施することができることは言うまでもない。

【0035】本発明の抗CETP抗体は、CETPの脂質転送活性部位を認識していないため、本発明のCETP測定法に於ては、失活したCETPを標準品として使用することが可能である。そのため、本発明のCETP測定法では、従来の脂質転送活性を有するCETP標準品（極めて不安定である。）を使用せざるを得なかった測定法よりも、CETP測定精度が大幅に向上している。

【0036】上記の如き測定法で使用する不溶性担体としては、通常の免疫学的測定法で用いられるものであれば何れも使用可能であるが、例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニール、ポリエチレン、ポリクロロカーボネート、シリコーン樹脂、シリコーンラバー等の合成高分子化合物、例えば多孔性ガラス、スリガラス、アルミナ、シリカゲル、活性炭、金属酸化物等の無機物質等が好ましく挙げられる。また、これら不溶性担体は、チューブ、ビーズ、ディスク状片、微粒子（ラテックス粒子）、マイクロプレート等多様な形態で使用し得る。なかでもマイクロプレートは、洗浄の容易さ及び多数の検体を同時処理する際の操作性等の点から特に好ましく用いられる。尚、不溶性担体としてマイクロプレートを使用する場合には、標識量の測定にマイクロプレートリーダーを利用すれば、より簡便に測定を行うことができる。また、このような不溶性担体に、抗原を固定化させる方法としては、公知の固定化方法、例えば共有結合により固定化する方法或いは物理的に吸着させて固定化する方法（特公平5-41946号公報等）等の固定化方法を利用すればよい。

【0037】本発明の測定法に於て、CETPと抗CETP抗体との抗原抗体複合物を測定するために使用する抗CETP抗体に対する抗体（二次抗体）を標識するため或はCETPをサンドイッチ法により測定する場合に用いられる標識抗CETP抗体を作製するために用いられる標識物質としては、例えばパーオキシダーゼ、マイクローパーオキシダーゼ、酸性フォスファターゼ、アルカリフォスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、

11

アセチルコリンエステラーゼ、リンゴ酸脱水素酵素、ルシフェラーゼ等の酵素、例えば ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^3H 等の放射性同位元素、例えばフルオレセイン、ダンシル、フルオレスカミン、クマリン、ナフチルアミン或はこれらの誘導体等の蛍光性物質、例えばルシフェリン、イソルミノール、ルミノール、ビス(2, 4, 6-トリフロロフェニル)オキサレート等の蛍光性物質、例えばフェノール、ナフトール、アントラセン或はこれらの誘導体等の紫外部に吸収を有する物質、例えば4-アミノ-2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド、3-アミノ-2, 2, 5, 5-テトラメチルピペリジン-1-オキシド、2, 6-ジ-*tert*-ブチル- α -(3, 5-ジ-*tert*-ブチル-4-オキソ-2, 5-シクロヘキサジエン-1-イリデン)-*p*-トリルオキシド等のオキシド基を有する化合物に代表されるスピラベル化剤としての性質を有する物質等、通常この分野で用いられている標識物質が全て挙げられる。

【0038】また、これらの標識物質を、抗CETP抗体に対する抗体或は抗CETP抗体に標識するには、例えば自体公知のEIA、RIA或はFIA等に於て一般に行われている自体公知の標識方法〔例えば、医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971；図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983；酵素免疫測定法、石川栄治、河合忠、室井潔編、第2版、医学書院、1982等〕を適宜利用して行えばよい。また、標識方法として、アビジン(又はストレプトアビジン)とビオチンの反応を利用した常法を利用しても良いことは言うまでもない。

【0039】本発明の測定法に於て抗原抗体複合物を生成させる際に使用される溶液としては、抗原抗体複合物の生成反応を妨げないものであれば良く特に限定されないが、通常この分野で用いられる緩衝液、例えばpH5~9、好ましくはpH6~8の1~500mM、好ましくは1~50mMの例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液、例えばBES緩衝液、MOPS緩衝液等のグッドの緩衝液等は全て挙げられる。尚、本発明の抗CETP抗体とCETPとの抗原抗体複合物を生成させる場合に使用するためには、該溶液中にSDSを上述した如き濃度範囲で含有させておかねばならないことは言うまでもない。尚、この溶液中には、通常この分野で安定化剤として使用されているもの、例えば糖類、蛋白質、界面活性剤等が、通常この分野で使用される濃度範囲内で含有されていても良い。

【0040】また、抗CETP抗体に対する標識抗体(二次抗体)或は標識抗CETP抗体を反応させて生成した標識された抗原抗体複合物中の標識量を測定する方法としては、標識物質の種類により異なるが、標識物質が有している何らかの方法により検出し得る性質に応じて、夫々所定の方法に従い実施すればよい。例えば、標

(7)

特開平9-77798

12

識物質が酵素の場合にはEIAの常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、51~63頁、共立出版(株)、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、標識物質が放射性物質の場合にはRIAの常法に従い、該放射性物質の出射放射線の種類及び強さに応じて液浸型GMカウンター、液体シンチレーションカウンター、井戸型シンチレーションカウンター、HPLC用カウンター等の測定機器を適宜選択して使用し、測定を行えばよい(例えば医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971等参照)。また、標識物質が蛍光性物質の場合には蛍光光度計等の測定機器を用いるFIAの常法、例えば「図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983」等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、標識物質が蛍光性物質の場合にはフォトカウンター等の測定機器を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、252~263頁、共立出版(株)、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて測定を行えばよい。更に、標識物質が紫外部に吸収を有する物質の場合には分光光度計等の測定機器を用いる常法によって測定を行えばよく、標識物質がスピンの性質を有する場合には電子スピン共鳴装置を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法、蛋白質 核酸酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、264~271頁、共立出版(株)、1987年9月10日発行」等に記載された方法に準じて夫々測定を行えばよい。

【0041】より具体的には、例えば標識物質が酵素である場合は、これを発色試薬と反応させて発色反応に導き、その結果生成する色素量を分光光度計等により測定する方法等の自体公知の方法が挙げられる。このような目的で用いられる発色試薬としては、例えば o -フェニレンジアミン、 o -ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド、2, 2'-アジノービス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン(ADPS)、 p -ニトロフェニルリン酸等、通常この分野で用いられる発色試薬が挙げられる。また、発色反応を停止させるには、例えば反応液に1~6Nの硫酸等の酵素活性阻害剤を添加する等、通常この分野で行われている反応停止方法を利用すればよい。

【0042】検体中のCETPを測定する目的で使用される、本発明の抗CETP抗体を含んでなるCETP測定用試薬は、上記した如き性質を有する抗CETP抗体を含んでいる以外は、自体公知の免疫学的測定用試薬に使用される試薬類を、この分野で使用される濃度範囲内で含有するように調製されたものであり、構成要件の好ましい態様や使用濃度等は、上で述べた通りである。

【0043】本発明の抗CETP抗体を含んでなるCE

50

13

TP測定用試薬は、上で述べた如き種々の免疫学的測定法に於て使用することが可能である。

【0044】本発明のCETPの免疫学的測定法を実施するにあたり、必要な試薬類を組み合わせたCETP測定用キットを利用しても良い。このようなキットとしては、SDSと抗CETP抗体を含有する試薬を組み合わせたキットは全て挙げられる。より具体的には、例えばCETP固定化プレートを使用する免疫学的測定法に使用する場合のキットとしては、①CETP固定化プレート、②検査線作成用標準CETP溶液、③SDS含有検体処理液、④抗CETP抗体含有試薬、⑤酵素標識された、抗CETP抗体に対する抗体含有試薬（以下、標識抗体含有試薬と略記する。）、⑥標識された酵素を検出するための発色試薬、⑦酵素反応停止液等を含んでなるキット形態が好ましく挙げられる。該キットの各種溶液や試薬中には、反応に悪影響を与えないものであれば、例えば糖類、蛋白質、界面活性剤等の安定化剤等を通常この分野で使用されている濃度範囲内で含有させておいても良い。また、抗CETP抗体含有試薬や標識抗体含有試薬等は、溶液でも凍結乾燥品でも良く、凍結乾燥品の場合、該キットにはその溶解用溶液を含有させておくことが好ましい。これら抗CETP抗体含有試薬や標識抗体含有試薬の溶液或いは凍結乾燥品溶解用溶液中には、緩衝剤、保存剤、安定化剤等を通常この分野で使用されている濃度範囲内で含有させておいても良い。

【0045】以下に、参考例及び実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。

【0046】

【実施例】

参考例 1 CETPの精製

ヒト新鮮血漿1000mlに硫酸アンモニウムを加え50%飽和とした後、4℃で1時間攪拌した。攪拌後、4℃で7000rpm/min、30分間遠心処理し、得られた沈殿を10mMリン酸緩衝液（0.15M NaCl、2mM EDTA含有、pH7.4）（以下、PBS緩衝液と略記する。）約100mlで溶解し、PBS緩衝液に対して4℃で一晩透析した（約51×2回）。次いで、得られた溶液を適量のNaBrを用いて、比重1.21~1.25g/mlに調整し、超速心分離機にて、255000×Gav、16℃で17時間超速心処理した後に、下層画分（比重が1.21g/ml以上の画分）を回収した。回収した下層画分を、予め10mM Tris-HCl緩衝液（2M NaCl、2mM EDTA含有、pH8.0）で平衡化したフェニルセファロースCL-4Bカラム（φ2.6×60cm、ファルマシア社製）にかけてCETPを吸着させた後、該カラムを該緩衝液約700mlで洗浄し、次いで2mM EDTA水溶液約700mlでCETP画分を溶出させた。得られたCETP画分に1/9容量の0.5M酢酸緩衝液（pH4.5）を添加、混合した後、予め50mM酢酸緩衝液（pH4.5）で平衡化したCM-セルロース（CM-52）カラム（φ2.5×17cm、ワッ

(8)

特開平9-77798

14

トマン社製）に通してCETPを吸着させた。該カラムを50mM酢酸緩衝液（pH4.5）約500mlで洗浄後、90mM NaClを含有した該緩衝液約500mlでCETPを溶出させて、粗精製CETP画分を得た。次に、得られた粗精製CETP画分を39mMリン酸緩衝液（0.025% EDTA含有、pH6.8）に対して透析し、これを、予め39mMリン酸緩衝液（0.025% EDTA含有、pH5.8）で平衡化した、サクシニル化低比重リボ蛋白（LDL）を固定化したセファロース4Bカラム（φ1.5×18cm、ファルマシア社製）にかけてCETPを吸着させた後、該カラムを39mMリン酸緩衝液（0.025% EDTA含有、pH5.8）約150mlで洗浄後、4mMリン酸緩衝液（pH5.8）でCETP画分を溶出し、精製CETPを得た。尚、得られた粗精製CETP画分、精製CETP画分（サクシニル化LDLカラム4mMリン酸緩衝液溶出画分）、対照として、サクシニル化LDLを固定化したセファロースカラムに吸着しなかった画分（サクシニル化LDLカラム非吸着画分）及びサクシニル化LDLを固定化したセファロースカラムを洗浄後、1mMリン酸緩衝液（pH5.8）で溶出した画分（サクシニル化LDLカラム1mMリン酸緩衝液溶出画分）を、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）【新版 電気泳動実験法 平井秀松ら監修 電気泳動学会編集 P288~298（1989）（株）文光社】により分画し、CETPの存在を確認した結果を図1に示す。【各蛋白質の検出は、銀染色IIキットワコー（和光純薬工業（株）製）を使用した、銀染色法により染色検出した。】

尚、図1中の各レーン番号は以下の試料を使用した結果を夫々示す。

30 Lane A：分子置マーカー（SDS-PAGEスタンダードLow：バイオラッド社製）

B：粗精製CETP

C：サクシニル化LDL非吸着画分

D：精製CETP（サクシニル化LDL 4mMリン酸緩衝液溶出画分）

E：サクシニル化LDL 1mMリン酸緩衝液溶出画分

また、図1中「←」印はCETP部位を示す。

【0047】実施例 1 抗CETPモノクローナル抗体の調製

40 参考例 1 で得られたCETP画分と分子置マーカー（SDS-PAGEスタンダードLow：バイオラッド社製）とを、10%SDS-PAGEにかけた後、分子置マーカーを流したポリアクリルアミドゲルのみをクイック CBB染色試薬（和光純薬工業（株）製）を用いて、クマシーブリリアントブルー（CBB）染色した。次いで、CETP画分を染したポリアクリルアミドゲルを蒸留水約100mlで2回洗浄し、CBB染色した分子置マーカーから推定した、分子量約74000のCETP画分に相当する部分を、約1mmの幅でポリアクリルアミドゲルから切り出した。切り出したゲル（10レーン分）にPBS緩衝液2

50

(9)

特開平9-77798

15

mlを加え、この混合液を22Gの注射針を付けた注射筒から数回押し出すことによりゲルを破碎し、これを抗原溶液とした。次いで、この抗原溶液を、リビ アジュバント システム MPL+TDM エマルジョン(リビ・イムノケム・リサーチ社製)の標準操作法に従って処理して調製した懸濁液を免疫原として、CETP量が0.1~10 μ g/匹となるように、マウスの腹腔内に該標準操作法に従って、1回目の免疫から3週間後に2回目の免疫を行い、更に2週間後に最終免疫を行った。最終免疫から3日後に、脾臓を摘出し、これを滅菌したスリガラスを用いて良くはぐした後、RPMI 1640培地(日本製薬(株)製)に懸濁、遠心分離処理を数回繰り返して、良く洗浄した。この洗浄した脾細胞1.5 $\times 10^6$ 個と、同様にRPMI 1640培地で良く洗浄したマウスのミエローマ細胞(P3-N5-1-Aq4(N5-1))1.5 $\times 10^6$ 個とを試験管に取り、混合した後該試験管の底に広げた。これに、RPMI 1640培地で50% (W/V)としたポリエチレングリコール6000(相光純薬工業(株)製)溶液1mlを静かに流し込み良く混和して、1分間細胞融合反応を行った後、RPMI 1640培地11mlを徐々に加えてPEGを希釈し、細胞融合反応を停止させた。得られた細胞懸濁液を1500rpmで5分間遠心処理して上清を除き、細胞を10%牛胎児血清を含んだRPMI 1640培地100mlに懸濁した。これを96穴マイクロプレート(各ウェルに0.1mlずつ分注し、5%CO₂の存在下、37℃でインキュベートした。24時間インキュベート後、通常の2倍濃度のHAT培地を各ウェルに0.1mlずつ分注し、およそ48時間インキュベート後には、通常のHAT培地で各ウェルの培養上清の培地交換を行った。細胞融合反応より1週間後、各ウェルの培養上清0.1mlを除去し、HT培地0.1mlを添加した。この操作をその翌日も行った。細胞融合反応より10日後、培養上清について、精製CETPを固相に用いたELISA法により抗体価*

表1

	TP-3	市販品	CM5a-27	CM5a-31	CM5a-39
ヒトIgG	◎	△	△	△	×
ヒトIgM	○	×	×	×	×
ヒトフィブリノゲン	○	×	×	×	×
力価	1	1/4	30	1/2	15

【0050】表1の結果から明らかな如く、本発明の抗CETPモノクローナル抗体は、TP-3と比較すると、測定妨害物質である血中蛋白質との交差反応性が非常に少ないことが判る。また、市販品の抗CETPモノクローナル抗体は、血中蛋白質との交差反応性は少ない

16

*を調べ、抗体活性の強いウェルの細胞を眼視希釈法によりクローニングを行った。更に、得られたクローンの培養上清について、ウェスタンブロッティング法を用いた免疫染色法[Towbin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350(1979)]により抗体の特異性を調べ、抗体活性が高く、特異性の高い抗体を産生するクローン3種類(CM5a-27、CM5a-31及びCM5a-39)を得た。

【0048】実施例 2 測定妨害物質との交差反応性の検討

実施例 1で得られた3クローンが産生する夫々のモノクローナル抗体と、測定妨害物質となる血中蛋白質との交差反応性を、血中蛋白質として、ヒトIgG、ヒトアルブミン及びヒトフィブリノゲンを夫々用いたウェスタンブロッティング法による免疫染色法[Towbin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350(1979)]により検討した。また、対照として、従来の抗CETPモノクローナル抗体であるTP-3[Svenon, T. L., et al., J. Biochem. 264, 14318-14326(1989)]及び市販品抗CETPモノクローナル抗体(シバヤキ社製)と血中蛋白質との反応性についても同様に検討した。結果を表1に示す。尚、表1に於て、◎、○、△及び×は血中蛋白質との反応性を示し、◎は非常に強く反応することを、○は強く反応することを、△は弱く反応することを、×は反応しないことを夫々示す。また、これら3種類の抗CETPモノクローナル抗体について、精製CETPを固相に用いたELISA法により、夫々の抗体力価を調べた。この結果もあわせて表1に示す。尚、表1中の力価は、TP-3の抗体力価を1としたときの相対値として示してある。

【0049】

【表1】

ものの、CETPとの反応力価が極めて低いことも判る。一方、本発明の抗CETPモノクローナル抗体のうちCM5a-27及びCM5a-39は、TP-3及び市販品の抗CETPモノクローナル抗体と比べて、CETPに対する反応力価が極めて高いことが判る。以上の

(10)

特開平9-77798

17

ことから、CETPの免疫学的測定法に於て使用する抗体としては、測定妨害物質との交差反応性が極めて低く且つCETPに対して高力価を示す本発明のモノクローナル抗体が最も適していることが判る。尚、上記のクローンのうち、CM5a-27とCM5a-39は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その寄託番号及び寄託日は以下の通りである。

クローンCM5a-27：寄託番号：FERM P-15156

寄託日：平成7年9月6日

クローンCM5a-39：寄託番号：FERM P-15157

寄託日：平成7年9月6日

【0051】実施例 3 検体中のCETPの測定

(1) CETP固定プレートの作製

参考例 1 で得られた精製CETP(0.2μg/ml)含有50mM炭酸緩衝液(pH9.6)100μlを、96穴マイクロプレートに分注し、4℃で16時間固定化処理し、次いで、1%BSAを含有するPBS緩衝液200μlで37℃で1時間ブロッキング処理した後、PBS緩衝液で4回洗浄して目的のCETP固定プレートを作製した。

(2) 検体の前処理

原発性胆汁性肝硬変(PBC)患者血漿23例及び健常者血漿25例を検体とし、夫々の検体10μlに、0.5%SDS水溶液10μlを添加し、37℃で1時間反応させた。得られた反応液に、CM5a-27モノクローナル抗体(1次抗体)17ngAb/ml含有10mMリン酸緩衝液(1%BSA含有、pH7.4)(PB緩衝液)200μlを添加し、37℃で1時間反応させて、処理検体を調製した。

(3) 検体中のCETPの測定

(2)で得られた処理検体50μlと、0.023%SDS水溶液50μlとを、上記(1)で作製したCETP固定プレートの各ウェルに添加し、37℃で2時間反応させた(未

18

反応のCM5a-27モノクローナル抗体とプレート上のCETPとの反応)。該プレートをPBS緩衝液で4回洗浄後、各ウェルにホースラディッシュパーオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリンサギボリクローナル抗体(2次抗体：ダコ・ジャパン社製)を1.3μgAb/ml含有PB緩衝液100μlを分注し、37℃で1時間反応させた。反応後、該プレートをPBS緩衝液で4回洗浄した後、o-フェニレンジアミン3mg/mlを含有する発色液(0.017% H_2O_2 及び50mMクエン酸含有、100mMリン酸緩衝液、pH4.8)100μlを各ウェルに分注し、室温で30分間酵素反応を行わせた後、6N塩酸100μlを各ウェルに添加してその反応を停止させた。各ウェルの吸光度を、SOF T max-J (Ver. 2.2, 和光純薬工業(株)製)により $\lambda = 490nm$ 、エンドポイント測定に条件設定したマイクロプレートリーダーUV max (モレキュラーデバイス社製)で測定した。得られた各吸光度を、予め精製CETPをPB緩衝液に添加して、CETP濃度が夫々、0、1.5、3、6、9、12μg/mlとなるように調製した標準CETP溶液を検体とした以外は上記と同じ試薬を用い、同様の操作を行なって得られた、CETP濃度と吸光度との関係を表す検量線にあてはめ、各検体中のCETP濃度を求めた。

(4) 結果

標準CETP溶液を用いて作製した検量線を図2に、また、検量線に基づいて求めた、各検体中のCETP濃度を表2に、更に、得られたCETP濃度に基づいた、PBC患者と健常者との間の有意差検定の結果を図3に、夫々示す。

【0052】

【表2】

(11)

特開平9-77798

19

20

表 2

Sample No.	P B C 患者	健常者
1	4. 1	3. 6
2	4. 3	3. 6
3	3. 9	3. 7
4	5. 7	2. 6
5	4. 3	3. 7
6	4. 6	3. 3
7	3. 9	3. 1
8	2. 4	2. 8
9	4. 4	3. 9
10	3. 3	3. 6
11	4. 4	3. 1
12	3. 8	3. 3
13	4. 1	3. 8
14	5. 0	3. 3
15	3. 3	3. 5
16	3. 2	3. 3
17	4. 5	3. 6
18	4. 1	3. 3
19	5. 0	3. 9
20	3. 7	3. 2
21	4. 6	—
22	4. 1	—
23	4. 3	—
n	23	20
M E A N	4. 13	3. 41

【0053】表2及び図3の結果から明らかな如く、PBC患者検体中のCETP濃度と、健常者検体中のCETP濃度との間には、明らかに有意差が認められることが判る。このことから、本発明の測定法により求めた各患者血漿中のCETP濃度を、PBC診断に利用することが可能となることも判る。

【0054】

【発明の効果】以上述べた如く、本発明は、CETPに対して高力価を有し、測定妨害物質である血中蛋白質に対する交差反応の程度が低い抗CETPモノクローナル抗体、SDSで処理したCETPと特異的に反応する抗体、該抗体を用いた検体中のCETPの免疫学的測定法、並びに、これに用いるCETP測定用試薬を提供するものであり、本発明の抗CETP抗体を使用したCETP測定法を利用することにより、従来の方法に比べて、簡便且つ高精度にCETPを測定し得るという効果を奏する発明であるので、新案に貢献するところ大なる発明である。

【図面の簡単な説明】

【図1】参考例。1で得られた各画分を、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた結果を示す。

【図2】実施例。3で得られた、コレステリルエステル転送蛋白(CETP)濃度と吸光度(OD.490nm)との関係を表す検査線を示す。

【図3】実施例。3で得られた、原発性胆汁性肝硬変(PBC)患者と健常者との間の有意差検定の結果を示す。

【符号の説明】

図1に於て、各レーン番号は以下の試料を使用して10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた結果を示す。

Lane A: 分子置マーカー (SDS-PAGEスタンダード low: バイオラッド社製)

B: 組精製CETP

C: サクシニル化低比重リポ蛋白(LDL)非吸着画分

D: 精製CETP (サクシニル化LDL 4mMリン酸緩衝

(12)

特開平9-77798

21

22

液溶出画分)

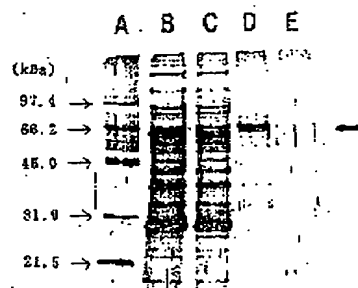
E: サクシニル化LDL100

* また、図1中「-」印はCETP部位を示す。

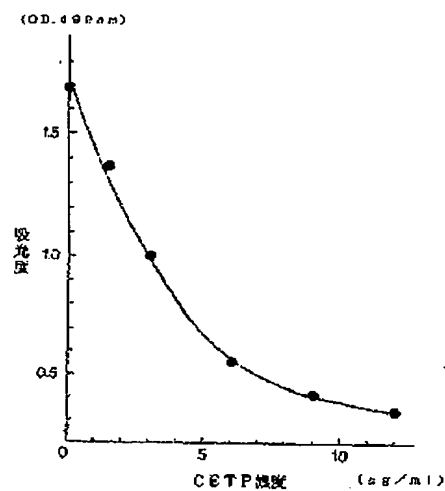
リン酸緩衝液溶出画分

*

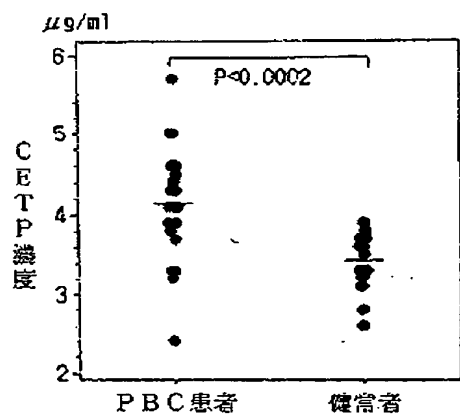
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A61K 39/395

識別記号

庁内整理番号

FI

A61K 39/395

技術表示箇所

N

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.